ヘルペスウイルスプロテアーゼの 活性制御機構と新たな阻害部位

味の素㈱ライフサイエンス研究所 榛葉信久

Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV), like all herpesviruses, encodes a protease (KSHV Pr), which is necessary for the viral lytic cycle. Herpesviral proteases function as obligate dimers, however, each monomer has an active site, which is spatially separate from the dimer interface. To address the potential of targeting the dimer interface, a 30 amino acid helical peptide was synthesized by protein grafting of an interfacial KSHV Pr α helix with a small stable protein, avian pancreatic polypeptide (aPP) to disrupt the dimerization of KSHV Pr. Biochemical analysis revealed that the rationally designed helical peptide inhibited KSHV Pr dimerization and activity. These results indicate that the dimer interface, as well as the active sites, of herpesvirus proteases is a viable target for inhibiting enzyme activity.

herpesvirus protease / Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus / dimer / protein grafting

1. はじめに

ヘルペスウイルスは世界中で最も流行しているウイルスの1つであり、およそ100種類が確認されている。ヒトに感染するヘルペスウイルスのうち、9つがさまざまな病気とかかわっており、例えば、疱疹や水疱瘡があげられる。また、ヒトを重篤な病気に至らしめるものとしてサイトメガロウイルスやカポジ肉腫ウイルス (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus; KSHV) が深刻な問題となっている。米国では1980年代にエイズ患者へカポジ肉腫 (Kaposi's sarcoma; KS) が広がったが、エイズ治療薬による効果も手伝い、現在では減少傾向にある^{1), 2)}。しかし、最近では、アフリカにおけるカポジ肉腫患者の数が大幅に増えている。実際に、ウガンダやジンバブエでは、男性のがんの第1位が、また女性のがんの第2位がカポジ肉腫である³⁾。

すべてのヘルペスウイルスは、配列のホモロジーの高いプロテアーゼを有し、これがウイルスの増殖に必須である。約25 kDaのプロテアーゼは、別のタンパク質と連結した形で発現する。このときプロテアーゼは不活性な単量体であるが、ウイルスが球形になり、そこに内包されると、濃度の上昇に伴って2量体を形成し活性体となる。その結果、プロテアーゼの作用によってウイルスが成熟体へと変形し、新たな細胞へと感染していく^{4), 5)}。それゆえ、ヘルペスウイルスプロテアー

ゼはドラッグターゲットとして考えられている⁷⁾。

ヘルペスウイルスプロテアーゼはセリンプロテアーゼの1つであり、herpes simplex virus, Varicella-Zoster virus, Epstein-Barr virus, human cytomegalovirus, KSHVが有するプロテアーゼの結晶構造が報告されている⁸⁾⁻¹⁵⁾。トリプシンに代表されるような消化酵素と比べて4桁も触媒活性 (k_{cat}/K_m) が低く、その1つの要因として活性部位がSer-His-AspではなくSer-His-Hisであることがあげられている。結晶構造はすべて2量体であるが、2量体間の相互作用は弱く、解離定数は μM オーダーである¹⁶⁾⁻¹⁸⁾。また、2量体形成に伴って活性化するにもかかわらず、2量体界面から離れた位置に活性部位が存在する。

我々は、ヘルペスウイルスプロテアーゼの1つであるKSHVプロテアーゼを題材として、活性部位のセリン残基と2量体界面の関連を解析し、2量体形成に伴う活性発現機構を明らかにした。一方、結晶構造から、ヘルペスウイルスの活性部位は非常に浅いポケットからなり、特異的な阻害剤を設計することが困難であると考えられた。実際にヘルペスウイルスプロテアーゼの活性部位をターゲットとした阻害剤がいくつか報告されてきたが、いまだ医薬品になった例がない。そこで、活性部位の代わりに、2量体形成を阻害するペプチドを設計し、プロテアーゼ活性を阻害できることを示した。2量体界面は非常に深いポケットで疎水的な残基が多い

Regulating the Activity of the Herpesviral Protease and Its Viable Target for Inhibition

Nobuhisa SHIMBA

Ajinomoto Co., Institute of Life Sciences

Fig. 1 Chemical structure of the optimized biotinyl-Pro-Val-Tyr-tBug-Gln-Ala^P-(OPh)₂ inhibitor.

ことから、特異的な阻害剤の開発に適していると考えられる。今後、2量体界面をターゲットとした阻害剤の開発により、特異的にウイルスの増殖を防ぐことが期待される。また、このように1つの分子の複数の部位をターゲットとすることにより、耐性ウイルスの出現を防ぐことができるかもしれない。

2. 活性部位の阻害

2.1 プロテアーゼの基質特異性解析と遷移状態アナログ

活性部位と2量体界面の相互作用を調べるために、活性部位に結合する阻害剤を作製した。リン酸基は遷移状態を模倣していることから、基質に付加すると活性部位のセリン残基を特異的に修飾し、擬似的な遷移状態を作り出すことができる^{19), 20)}。しかし、リン酸基の特異性は低いので、基質にはプロテアーゼ認識サイトを付加する必要がある。天然の切断サイトが一例にはなるが、最適とは限らないので、Craigらが開発したpositional scanning synthetic combinatorial libraries (PS-SCL)²¹⁾を用いて、P1-P4サイトを決定した。本方法では、基質ペプチドの各サイトに20種のアミノ酸を導入したライブラリーを作製し、プロテアーゼによって切断しやすい順を決めることができる。KSHVプロテアーゼに適用したところ、P1サイトにはアラニン、P2サイトにはノルロイシン、P3サイトにはバリン、P4サイトにはチロシンが最適な残基であることが判明した。これらのアミノ酸残基のうち、溶解度を向上させるためにノルロイシンをグルタミン(ノルロイシンの約2/3の反応性)へ置換し、また、P3サイトには、過去の知見²²⁾にもとづきバリンの代わりに*tert*-butylglycineを導入した。さらに、天然の基質の配列を参考にしてP5サイトとP6サイトにそれぞれバリンとプロリンを加えた上で、Fig. 1に示したようにリン酸基を付加することによって基質アナログを合成した。このようなステップを経ることによって、特異性が高く、かつ溶解度の高い基質アナログが設計できた。

まず、本化合物存在下においてKSHVプロテアーゼ

活性を追跡することにより、本化合物が不可逆的に結合し活性を阻害していることを明らかにした²³⁾。基質アナログが結合したKSHVプロテアーゼは、あたかも遷移状態でロックされた状態であり、ペプチド結合の切断過程を的確に描写していると考えられる。

2.2 活性阻害と2量体界面

KSHVプロテアーゼにはメチオニン残基が2カ所しかなく、そのうちの一方(Met197)は2量体界面に位置している。単量体と2量体のNMRシグナルを比較すると、2量体界面に位置するアミノ酸残基において異なることが予想される。そこで、KSHVプロテアーゼの2量体形成を追跡する上で、Met197のNMRシグナルが指標になると考えた。特にメチオニン残基の側鎖メチル由来のシグナルの感度が良好であることを考慮して、メチオニン側鎖の¹³C標識を行った。その結果、KSHVプロテアーゼ単独のHSQCスペクトル上に、3個のピークが観測された。Met197の改変や異なる濃度でのHSQCスペクトルを解析することによって、3個のピークのうち2つは、それぞれ単量体と2量体のMet197由来のシグナルであることが判明した(Fig. 2)。つまり、NMR測定を実施した濃度(約25 μM)では、KSHVプロテアーゼは単量体と2量体の平衡状態にあることを示している。続いて、基質アナログを添加し、遷移状態を模倣した状態にて同様な測定を行ったところ、単量体由来のシグナルが消失した(Fig. 2)。遷移状態を形成する過程において、KSHVプロテアーゼは強固な2量体を形成することを意味する。活性部位は2量体界面と約15オングストロームも離れているにもかかわらず、基質アナログの結合に伴い分子間の相互作用が強化され、2量体が安定化される。KSHVプロテアーゼの立体構造からは、界面に位置するα5と触媒の3点セット(catalytic triad; 活性部位のSer, His, His残基)の間に直接的な相互作用が見られていないことから、驚くべきことである。

遷移状態では、catalytic triadと、それが隣接するループ(Fig. 3b; loop)との相互作用を介して、α6(Fig. 3b; α6 helix)へと構造変化が誘起される。α6とα5はペプチ

Fig. 2 Inhibition of KSHV Pr stabilizes the dimeric conformation. HSQC spectra of KSHV Pr labeled with methyl ^{13}C methionine after incubation with or without inhibitor. Signals reveal the solution oligomeric state of protease: M1, N terminus; Met197(M), monomer; Met197(D), dimer. 文献 23 (Marnett *et al.* *PNAS*) より転載. (カラー図は電子ジャーナル<http://www.jstage.jst.go.jp/browse/biophys/>参照)

ド結合によって連結されているため, catalytic triadへ基質類縁体が結合することによる影響が $\alpha 5$ へと伝達されると考えられる. このような相互作用ネットワークが形成された結果, $\alpha 5$ が安定化され, 分子間の相互作用が強くなるのであろう. 以上のように, KSHVプロテアーゼの立体構造と, 基質アナログによって誘起される2量体形成の安定化にもとづくと, KSHVプロテアーゼの活性化には2量体形成が必須であり, その鍵となるのは $\alpha 5$ や $\alpha 6$ の構造変化であることが推察された. 裏返せば, $\alpha 5$ や $\alpha 6$ の構造変化を誘起しないようにすれば, 活性部位から離れた2量体界面であってもKSHVプロテアーゼを阻害できると考えられる. しかしながら, 今までに2量体界面を標的としてヘルペスウイルスプロテアーゼの活性を阻害した例はない.

3. 2量体形成の阻害

3.1 2量体形成阻害ペプチドの設計

KSHVプロテアーゼの2量体界面では, 一方の $\alpha 1$ と $\alpha 2$ が他方の $\alpha 5$ と相互作用している (Fig. 3b). そこで, $\alpha 5$ の領域のみを模倣したペプチドを設計する. $\alpha 5$ のみを模倣したペプチドは, $\alpha 1$ と $\alpha 2$ 領域をもたないため, 相互作用した相手の分子の $\alpha 5$ が安定化されることはなく, プロテアーゼ活性阻害を引き起こすと推察される. 本研究ではそれを実証した.

まず, 2量体形成を阻害するため, 16残基のペプチ

ドを設計した (Fig. 3a). KSHVプロテアーゼの2量体界面に存在する $\alpha 5$ の配列には, KSHVプロテアーゼによる切断サイトが含まれているため, Ser13をグリシンへと置換し, KSHVプロテアーゼ中でもペプチドが安定に存在できるように工夫した ($\alpha 5$ ペプチドとよぶ). 対応する箇所に同様な置換 (S204G/KSHV Pr)を導入した変異体も, 野生型のKSHVプロテアーゼと同じように2量体化するため, セリンからグリシンへの置換によって相互作用様式の大きな変化は引き起こされない¹⁷⁾. しかしながら, $\alpha 5$ ペプチド単独では溶液中で α ヘリックスを形成することはない, より強く相互作用させるためには, α ヘリックス構造を保持するように設計し, KSHVプロテアーゼと相互作用させる際に α ヘリックスを形成する必要性をなくすことが望ましい.

そこで, プロテイングラフティング[※]によって α ヘリックスを形成させた上で, KSHVプロテアーゼの相互作用界面を模倣したペプチドを設計した. avian pancreatic polypeptide (aPP) は, 36残基の小さい分子にもかかわらず安定なタンパク質であり, α ヘリックスがpolyproline helixとの相互作用によって安定化されている²⁴⁾. しかも, aPP分子の一方の面のみが α ヘリックスの安定化に関与しており, 溶媒へ露出している残基に関してはKSHVプロテアーゼの $\alpha 5$ を模倣するように置換することが可能である²⁵⁾. そこで, KSHVプロテアーゼの立体構造にもとづき, 相互作用に重要な9残

基を選択し (Fig. 3a), aPPへと導入した. このペプチドをKSaPPとよぶ.

続いてKSHVプロテアーゼとKSaPPの複合体のモデル構造を構築したところ, Asn29, Thr32, C末端の側鎖が立体障害となることが推測された (Fig. 3c). さらに, aPPのC末端は無秩序な構造であり, α ヘリックスの形成に必須ではない. その結果, Asn29をグリシンへ置換することに加え, N末端Gly1とC末端Thr32-Tyr36を削除し, 30残基のペプチド (KSDDペプチド) を設計するに至った.

円二色性 (CD) 測定の結果, $\alpha 5$ ペプチドは α ヘリックスを形成していないことが示された. 一方, KSDDペプチドは, α ヘリックスを含有するタンパク質に典型

的なスペクトルを与えた. α ヘリックスの含有量を見積もったところ, 約40%であり, すでに報告されていたaPPやその類縁タンパク質のヘリックス含量と一致することがわかった²⁶⁾. 以上の結果, プロテイングラフティングによって設計したKSDDペプチドは, α ヘリックスを形成していることが判明した.

3.2 活性阻害と阻害様式

$\alpha 5$ ペプチドとKSDDペプチドそれぞれを添加した上で, KSHVプロテアーゼの活性を測定した. プロテアーゼと基質の濃度を固定し, 両ペプチドの濃度を変化させることによって得られた阻害曲線を Fig. 4に示す. $\alpha 5$ ペプチドはKSHVプロテアーゼより400倍も高い濃度でも阻害活性を示さなかった一方, KSDDペプチドは,

(a)

(b)

(c)

Fig. 3 Strategy for the design of the KSDD peptide. (a) Sequence alignment of aPP and the $\alpha 5$ helix in KSHV Pr, and designed sequences of the KSaPP and KSDD peptides. Specific residue numbers are given above peptide sequences, and the corresponding residue numbers in KSHV Pr are given in parentheses. The nine residues (Leu193, Glu194, Met197, Ala198, Ala200, Ile201, Asp202, Gly204, Phe205) in the $\alpha 5$ helix of one monomer of KSHV Pr interact with the second monomer of KSHV Pr. Residues, Pro2, Gln4, Pro5, Tyr7, Pro8, Leu17, Phe20, Leu24, Tyr27, Leu28, Val30, and Val31, in the aPP sequence are required for stabilizing the helical structure. Based on the model structure of the KSHV Pr-KSaPP complex (panel c), conflicting or functionally unnecessary residues in KSaPP are expected to be Gly1, Asn29, Thr32-Tyr36. The mutation site for attenuation of autolysis is Gly13 in the $\alpha 5$ peptide. (b) Dimer interface in the crystal structure of KSHV Pr. (c) A model structure of the KSHV Pr-KSaPP peptide complex was constructed by replacing the $\alpha 5$ helix in one monomer of KSHV Pr with aPP. Formation of the hydrophobic aPP core requires residues on only one face of the α -helix. The opposite, solvent-exposed face of the α -helix is available for recognition of KSHV Pr; these residues interact with the other monomer. A combined sequence was generated and referred to as KSaPP. The wild-type KSHV Pr serine residue was reintroduced at the position of Gly13 in the KSaPP peptide because the autolysis site present in KSHV Pr and the $\alpha 5$ peptide no longer exists in KSaPP. The KSDD peptide was finally designed by replacing Asn29 with a glycine and by removing Gly1 and Thr32 through Tyr36. (カラー図は電子ジャーナル<http://www.jstage.jst.go.jp/browse/biophys/> 参照)

Fig. 4 Peptide concentration dependence of KSHV Pr specific activity. The KSDD peptide inhibits KSHV Pr (filled diamonds) or KSHV Pr M197L (filled circles) activity by 50% at a ~200- or 400-fold molar excess of peptide over KSHV Pr or KSHV Pr M197L, respectively. In contrast, the $\alpha 5$ peptide did not inhibit KSHV Pr activity at concentrations up to 400-fold higher than KSHV Pr concentrations (gray circles). 文献 27 (Shimba *et al. J. Virol.*) より転載。(カラー図は電子ジャーナル <http://www.jstage.jst.go.jp/browse/biophys/> 参照)

濃度依存的に KSHV プロテアーゼ活性を阻害した。

Fig. 4からは、KSHVプロテアーゼに対し約200倍のペプチドを添加することによって、活性が50%へと低下することがわかる。また、2量体形成阻害に伴って活性が阻害されていることを確認するために、ゲルろ過カラムによる分析も実施した。その結果、KSDDペプチド存在下においてKSHVプロテアーゼが単量体化していることが判明した。

さらに、KSDDが2量体形成界面と相互作用していることを確認するため、KSHVプロテアーゼの変異体を作製した。2量体界面の残基を置換した変異体では、KSDDペプチドの効果が異なることを示す。まず、2量体界面の相互作用を変化させることを目的とし、立体構造にもとづきいくつかの変異体を設計したところ、M197Lでは分子間の相互作用がより強くなり、2量体が安定化していることが判明した。Met197は2量体界面に位置し、もう一方の分子のMet197と相互作用しているので、これらをロイシンに置換することによって相互作用が強くなったと考えられる。この変異体は、2量体界面の残基が置換されているにもかかわらず、2量体を形成する能力を有しているので、活性を指標として2量体形成阻害剤の効果を比較することができる。KSDDペプチド存在下において、M197L変異体の活性を測

定したところ、活性を50%へ低下させるには、約400倍のKSDDペプチドが必要であることがわかった (Fig. 4)。これは、野生型の場合の約2倍である。2量体界面を置換した変異体と野生型ではKSDDペプチドの効果が異なることは、2量体界面に結合するようにKSDDペプチドを設計した背景と矛盾していない。

4. まとめ

酵素の活性部位の阻害は非常に魅力的ではあるが、KSHVプロテアーゼのように活性部位が浅い谷間である場合には困難を伴う。また、ウイルスの増殖を防ぐことを目的とするときには、かならず耐性株の出現に配慮する必要があり、ターゲットタンパク質の複数の部位を阻害することは医薬品開発には有望な手段である。我々は、ヘルペスウイルスの増殖に欠かせないプロテアーゼを題材として、活性部位から空間的に離れた位置にある2量体界面をターゲットとして、プロテアーゼ活性を阻害することに成功した。つまり、2量体界面も活性部位と同じようにヘルペスウイルスプロテアーゼを阻害する上でターゲットとなり得ることを証明した。ヘルペスウイルスプロテアーゼの2量体形成阻害によって選択性高くウイルスの増殖を抑制できる可能性があり、感染を防ぐ上で貴重な知見となるであろう²⁷⁾。

謝 辞

本稿にて紹介した研究は、Charles S. Craik教授、Anson M. Nomura博士、Alan B. Marnett博士 (カリフォルニア大学サンフランシスコ校) との共同研究によるものです。また、鈴木榮一郎理事 (味の素㈱) には多くの助言を頂きました。この場を借りて感謝申し上げます。

文 献

- 1) Parisi, S. G., Mazzi, R., Sarmati, L., Carolo, G., Uccella, I., Rianda, A., Nicastri, E., Concia, E. and Andreoni, M. (2002) *AIDS* **16**, 1089-1091.
- 2) Tam, H. K., Zhang, Z. F., Jacobson, L. P., Margolick, J. B., Chmiel, J. S., Rinaldo, C. and Detels, R. (2002) *Int. J. Cancer* **98**, 916-922.
- 3) Dedicoat, M. and Newton, R. (2003) *Br. J. Cancer* **88**, 1-3.
- 4) Welch, A. R., Woods, A. S., McNally, L. M., Cotter, R. J. and Gibson, W. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 10792-10796.
- 5) Weinheimer, S. P., McCann, P. J., III, O'Boyle, D. R., II, Stevens, J. T., Boyd, B. A., Drier, D. A., Yamanaka, G. A., Dilanni, C. L., Deckman, I. C. and Cordingley, M. G. (1993) *J. Virol.* **67**, 5813-5822.
- 6) Sheaffer, A. K., Newcomb, W. W., Brown, J. C., Gao, M., Weller, S. K. and Tenney, D. J. (2000) *J. Virol.* **74**, 6838-

- 6848.
- 7) Waxman, L. and Darke, P. L. (2000) *Antiviral Chem. Chemother.* **11**, 1-22.
 - 8) Chen, P., Tsuge, H., Almassy, R. J., Gribskov, C. L., Katoh, S., Vanderpool, D. L., Margosiak, S. A., Pinko, C., Matthews, D. A. and Kan, C. C. (1996) *Cell* **86**, 835-843.
 - 9) Tong, L., Qian, C., Massariol, M. J., Bonneau, P. R., Cordingley, M. G. and Lagacé, L. (1996) *Nature* **383**, 272-275.
 - 10) Shieh, H. S., Kurumbail, R. G., Stevens, A. M., Stegeman, R. A., Sturman, E. J., Pak, J. Y., Wittwer, A. J., Palmier, M. O., Wiegand, R. C., Holwerda, B. C. and Stallings, W. C. (1996) *Nature* **383**, 279-282.
 - 11) Qiu, X., Culp, J. S., DiLella, A. G., Hellmig, B., Hoog, S. S., Janson, C. A., Smith, W. W. and Abdel-Meguid, S. S. (1996) *Nature* **383**, 275-279.
 - 12) Qiu, X., Janson, C. A., Culp, J. S., Richardson, S. B., Debouck, C., Smith, W. W. and Abdel-Meguid, S. S. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 2874-2879.
 - 13) Reiling, K. K., Pray, T. R., Craik, C. S. and Stroud, R. M. (2000) *Biochemistry* **39**, 12796-12803.
 - 14) Hoog, S. S., Smith, W. W., Qiu, X., Janson, C. A., Hellmig, B., McQueney, M. S., O'Donnell, K., O'Shannessy, D., DiLella, A. G., Debouck, C. and Abdel-Meguid, S. S. (1997) *Biochemistry* **36**, 14023-14029.
 - 15) Buisson, M., Hernandez, J. F., Lascoux, D., Schoehn, G., Forest, E., Arlaud, G., Seigneurin, J. M., Ruigrok, R. W. and Burmeister, W. P. (2002) *J. Mol. Biol.* **324**, 89-103.
 - 16) Buisson, M., Valette, E., Hernandez, J. F., Baudin, F., Ebel, C., Morand, P., Seigneurin, J. M., Arlaud, G. J. and Ruigrok, R. W. (2001) *J. Mol. Biol.* **311**, 217-228.
 - 17) Pray, T. R., Nomura, A. M., Pennington, M. W. and Craik, C. S. (1999) *J. Mol. Biol.* **289**, 197-203.
 - 18) Cole, J. L. (1996) *Biochemistry* **35**, 15601-15610.
 - 19) Sampson, N. S. and Bartlett, P. A. (1991) *Biochemistry* **30**, 2255-2263.
 - 20) Oleksyszyn, J. and Powers, J. C. (1991) *Biochemistry* **30**, 485-493.
 - 21) Harris, J. L., Backes, B. J., Leonetti, F., Mahrus, S., Ellman, J. A. and Craik, C. S. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 7754-7759.
 - 22) Ogilvie, W., Bailey, M., Poupart, M. A., Abraham, A., Bhavsar, A., Bonneau, P., Bordeleau, J., Bousquet, Y., Chabot, C., Duceppe, J. S. *et al.* (1997) *J. Med. Chem.* **40**, 4113-4135.
 - 23) Marnett, A. B., Nomura, A. M., Shimba, N., Mahrus, S., Ortiz de Montellano, P. R., and Craik, C. S. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 6870-6875.
 - 24) Glover, I., Haneef, I., Pitts, J., Wood, S., Moss, D., Tickle, I., and Blundell, T. (1983) *Biopolymers* **22**, 293-304.
 - 25) Zondlo, N. J. and Schepartz, A. (1999) *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 6938-6939.
 - 26) Noelken, M. E., Chang, P. J. and Kimmel J. R. (1980) *Biochemistry* **19**, 1838-1843.
 - 27) Shimba, N., Nomura, A. M., Margnett, A. B. and Craik, C. S. (2004) *J. Virol.* **78**, 6657-6665.

ヘルペスウイルスプロテアーゼの活性制御機構と新たな阻害部位

榎葉信久

榎葉信久（しんば のぶひさ）

味の素㈱ライフサイエンス研究所研究員

1998年東京大学大学院薬学系研究科修了（薬学博士）、98-02年味の素㈱中央研究所研究員、02-04年UCSF博士研究員、04年より現職へ。

研究内容：タンパク質の立体構造解析とその情報にもとづくタンパク質工学やリガンド設計

連絡先：〒210-8681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1-1

E-mail: nobuhisa_shimba@ajinomoto.com